RENDICONTI DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI
Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali
Estratto dal vol. XXV, serie 5ª. 1° sem., fasc. 9°. — Seduta del 7 maggio 1916

SULL'ORIGINE DELLE RETI NERVOSE

NELLE

COLTURE DI TESSUTI

A
410

NOTA

DI

GIUSEPPE LEVI

ROMA
TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI
PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI

1916

Anatomia. — *Sull'origine delle reti nervose nelle colture di tessuti* [1]. Nota di GIUSEPPE LEVI, presentata dal Corrispondente GINO GALEOTTI.

Gli studî, non molto numerosi invero, sullo sviluppo delle fibre nervose nelle colture di tessuti, non hanno sufficientemente illustrato il destino di quelle fibre, specialmente dal punto di vista delle connessioni fra loro esistenti.

Harrison [2] accenna alla possibilità che le fibre nervose provenienti dal midollo di embrione di rana formino delle reti; in una delle sue figure (fig. 29) è riprodotto un gruppo di fibre nervose, provviste bensì di estremità libere col caratteristico fiocchetto terminale, ma riunite fra loro da molte anastomosi; però, dopo qualche tempo, le anastomosi scomparivano e le fibre si rendevano indipendenti. Inoltre Harrison mette in guardia contro la possibilità di errori: un semplice contatto fra fibre tanto delicate può dare la illusione di anastomosi.

W. H. e M. R. Lewis [3], in colture di intestino di embrioni di pollo in mezzi liquidi inorganici, osservarono la formazione di vaste reti simpatiche; le fibre crescono dapprima isolate o riunite a gruppi, ma già dopo 10 ore incominciano a stabilirsi delle anastomosi delicatissime fra le singole fibre oppure fra i rami di divisione di una stessa fibra, e queste più tardi diventano sempre piò numerose. Si tratta di filamenti esilissimi, che si costituiscono per movimento ameboide del cilindrasse e, per lo più, di esistenza transitoria; alcuni però si conservano, e si arriva così alla formazione di vaste ed intricate reti.

Durante le ricerche da me intraprese da qualche tempo su colture di tessuto nervoso di embrioni di pollo in plasma sanguigno, ho dedicato particolare attenzione al problema delle connessioni fra fibre e cellule nervose, e mi convinsi che esso può per questa via avvicinarsi alla soluzione; è evidente che in tali condizioni i rapporti fra gli elementi nervosi vengono ad essere molto semplificati, senza tener conto dell'inestimabile vantaggio di poter seguire di minuto in minuto le trasformazioni alle quali ciascuna fibra

(1) Dall'Istituto di Anatomia umana della R. Università di Palermo.

(2) Harrison B. G., *The outgrowth of the Nerve Floer as a mode of Protoplasmic movement.* Journ. of exp. zool., 1909, vol. IX, pag. 788.

(3) Lewis W. H. e Lewis M. R., *The cultivation of sympathetic nerves from the intestine of chick emhryos in saline solution.* Anat. Rec., 1912, vol. XI, pag. 7.

nervosa va incontro, studiando le colture sotto il microscopio mantenuto alla temperatura di 39°.

Con grande frequenza, tanto in colture viventi quanto in preparati fissati, ho riscontrato delle reti nervose, ed in casi fortunati ho assistito anche alla loro formazione. E, da quanto ho osservato, mi sembra che le varie modalità di connessioni fra elementi nervosi possono essere riunite nei seguenti gruppi:

1) Anastomosi fra neuroblasti. In tutte le colture si notano molti neuroblasti che dal pezzo esplantato si sono spostati nel plasma coagulato. Harrison ammette la possibilità di una migrazione attiva (almeno nella rana) di neuroblasti nel coagulo. Burrow si limita ad accennare alla presenza di cellule intercalate sul tragitto delle fibre nervose, ma fa qualche riserva sulla loro natura nervosa.

Le cellule si presentano naturalmente con apparenze diverse, a seconda dello stadio di sviluppo del pezzo espiantato; di neuroblasti bipolari in colture di midollo e di rombencefalo di embrioni al 3° o 4° giorno; di cellule multipolari in colture di tetto ottico o di telencefalo di embrioni più inoltrati (fra il 4° ed il 10° giorno). Mi sembra probabile che allo spostamento dei neuroblasti contribuiscano i movimenti attivi del loro protoplasma; ma esso avviene principalmente in seguito alla trazione, esercitata su quegli elementi, dai filamenti di fibrina; e lo dimostra il fatto che i prolungamenti dei neuroblasti sono dapprima sinuosi, ma, quando le cellule si allontanano dal pezzo, le fibre che congiungono quest'ultime coi neuroblasti diventano rigide e sempre più sottili.

Quasi tutte le cellule emigrate sono fra loro congiunte da prolungamenti anastomotici; si tratta di semplice accollamento, oppure di una vera continuità di sostanza? Accettando la seconda supposizione, le anastomosi dovrebbero preesistere nel pezzo esplantato e si renderebbero manifeste per effetto della migrazione delle cellule. La persistenza delle connessioni, quando le due cellule si allontanano l'una dall'altra, ci farebbe ritenere che si tratti di una vera fusione anzichè di un semplice contatto, come giustamente rileva Harrison, perchè, se la seconda supposizione fosse esatta, le due cellule si separerebbero per effetto della trazione esercitata sui prolungamenti.

La vitalità di questi elementi è limitata: per qualche tempo l'estremità del loro neurite si accresce in maniera caratteristica per attività del fiocchetto terminale; ma ben presto nel citoplasma appaiono granulazioni refrangenti, la cellula si rigonfia, l'accrescimento del neurite finisce con l'arrestarsi ed infine tutti i prolungamenti impallidiscono e scompaiono. Ho notato che, quando le cellule restano congiunte da uno o due prolungamenti al pezzo esplantato, esse sopravvivono più a lungo che non quando sono del tutto libere.

2) Anastomosi ad arcata fra le estremità distali di due fibre o dei due rami di divisione di un unico cilindrasse talora transitorie altre volte permanenti. Gli estremi di due fibre, in grazia dei movimenti ameboidi, si dirigono l'uno verso l'altro e si anastomizzano. Che non si tratti di un semplice accollamento è dimostrato dalla circostanza seguente: che, quando le due fibre hanno spessore differente, si stabilisce una specie di equilibrio fra di esse, ingrossando un estremo a spese della sostanza dell'altro. Il passaggio di protoplasma da una fibra all'altra appare specialmente evidente quando una o tutte e due le estremità sono rigonfie; allora vediamo scorrere la massa protoplasmatica lungo l'arcata che si è formata fra le due fibre.

Ciò fu osservato nelle fibre che qui riproduco, le quali furono seguìte sotto il microscopio durante tre ore consecutive (fig. A 1-6); si tratta di una fibra la quale si stacca da un plesso intricato e che si divide in tre rami *a*, *b*, *c*; di questi, *b* e *c* si ispessiscono alla loro estremità e dal rigonfiamento partono sottili filamenti, i più lunghi dei quali si uniscono alla fibra *a* (ore 9,45), che alla sua volta presenta un rigonfiamento terminale. Nel frattempo la fibra *b* si allunga; la sottile anastomosi che l'univa alla fibra *a* viene trascinata in avanti, ed infine l'estremità ispessita della fibra *b* si unisce alla fibrilla che collegava *a* e *c*. Alle 10,22 i filamenti anastomotici sono scomparsi; ma le fibre *a* e *b* si sono riunite con le loro estremità ispessite, costituendo un'arcata, in una massa unica, la quale cambia continuamente di forma: e ciò dimostra in modo esauriente che non si tratta di un accollamento, ma di una vera e propria fusione. Ad ore 11 la breve sporgenza che si dipartiva dall'arcata si è assottigliata in un lungo filamento, il quale cresce come di solito, emettendo dei filamenti fugaci.

Ben presto però le due fibre riacquistano la loro indipendenza e crescono nel modo consueto; ed il nuovo prolungamento, che si dipartiva dal punto di unione fra *a* e *b*, diviene l'estremità distale della fibra *a* (fig. A *b*).

Le tre fibre continuano a crescere per qualche tempo, ma con differente rapidità; dopo un'ora *c* ha una lunghezza doppia di *a* e *b*.

3) Anastomosi mediante sottili rami collaterali fra neuriti provenienti da neuroblasti differenti, o più spesso fra i rami di divisione di uno stesso neurite, od infine fra gli esili filamenti che costituiscono il fiocchetto terminale di una fibra.

Quest'ultima possibilità è la più frequente; in quasi tutti i fiocchetti terminali riccamente provvisti di espansioni, queste sono quasi sempre unite da delicati filuzzi, i quali però hanno un'esistenza quanto mai fugace.

Maggiore importanza per il problema delle connessioni hanno la prima e la seconda modalità di anastomosi, le quali furono di già descritte e raffigurate da W. e M. Lewis.

Nella fig. A, in 2 e 3 sono riprodotti questi filamenti anastomotici. Importante è il tragitto retrogrado che acquista la fibrilla la quale unisce

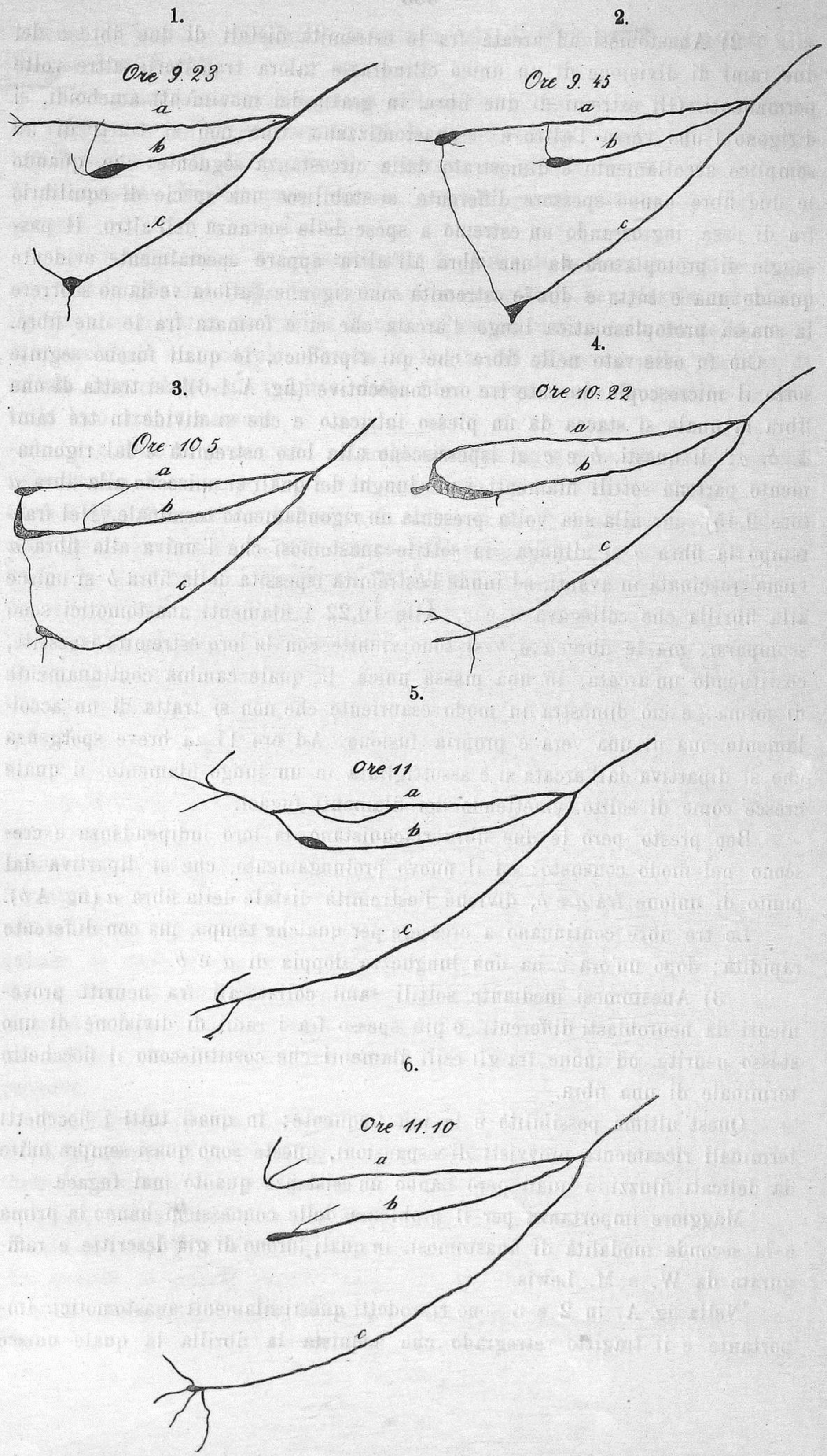


Fig. A. — Da una coltura di 18 ore di un frammento di rombencefalo di un embrione di pollo di 4 giorni e 6 ore. Temp. 39°. Apocrom, Imm. Zeiss 3 mm. Oc. 8.

a e *b*, perchè esso è una riprova che fra le due fibre si è stabilita una vera e propria anastomosi; se si fosse trattato di un semplice accollamento, il filamento si sarebbe distaccato da *a*, per effetto della trazione su di esso esercitata. Quando essi si staccano dal tratto prossimale di un neurite, anzichè dirigersi verso una fibra vicina, possono ricongiungersi alla stessa fibra da cui hanno preso origine formando un'ansa (fig. A, 5). Non di rado dalla prima ansa si diparte un nuovo filuzzo, il quale si salda al primo od alla fibra principale; e così di seguito. Il più sovente questi filamenti scompaiono, ma possono formare anche delle anastomosi permanenti; ed allora si vengono a costituire quelle reti a larghe maglie, quali si incontrano con tanta frequenza nelle colture. Evidentemente i tentativi di anastomosi fra fibre nervose sono comunissimi; ma soltanto quelle che si trovano in condizioni favorevoli diventano permanenti.

4) Delicate reti neurofibrillari si possono formare in modo del tutto diverso da quello fin qui illustrato: per comparsa di piccoli vacuoli rotondeggianti, i quali divaricano i fascetti di fibrille, e ben presto si estendono; le fibrille che li delimitano si assottigliano e si formano delle semplici anse od anche immagini più complesse, vere reti neurofibrillari intercalate sul decorso di una fibra; i vacuoli si costituiscono evidentemente per aumento, in una regione determinata della fibra, della sostanza interfibrillare. Scelgo dai miei protocolli di esperienza il seguente esempio (fig. B).

Una cellula gangliare si è quasi del tutto separata dal pezzo espiantato (un frammento di rombencefalo); da essa si diparte un cilindrasse assai lungo e grosso, che resta indiviso sino al suo estremo distale, ove si divide ad angolo acuto in due brevi rami, i quali terminano, come di consueto, con un fiocchetto di fibrille (ore 10); alle ore 10,40 si sono costituite delle anse per divaricamento delle fibrille (fig. B, 2), e nel ramo di divisione inferiore sono apparsi due piccoli vacuoli; circa un'ora dopo (fig. B, 3), le due fibre si sono allungate e molto assottigliate; i vacuoli si sono nel frattempo tanto ingranditi, che i fasci di fibrille che li delimitano costituiscono una vera ansa a forma affusata, intersecata da fini filamenti; due ore e mezzo dopo, le fibre si sono ulteriormente accresciute ed assottigliate, e le anse si sono modificate e spostate (fig. B, 4).

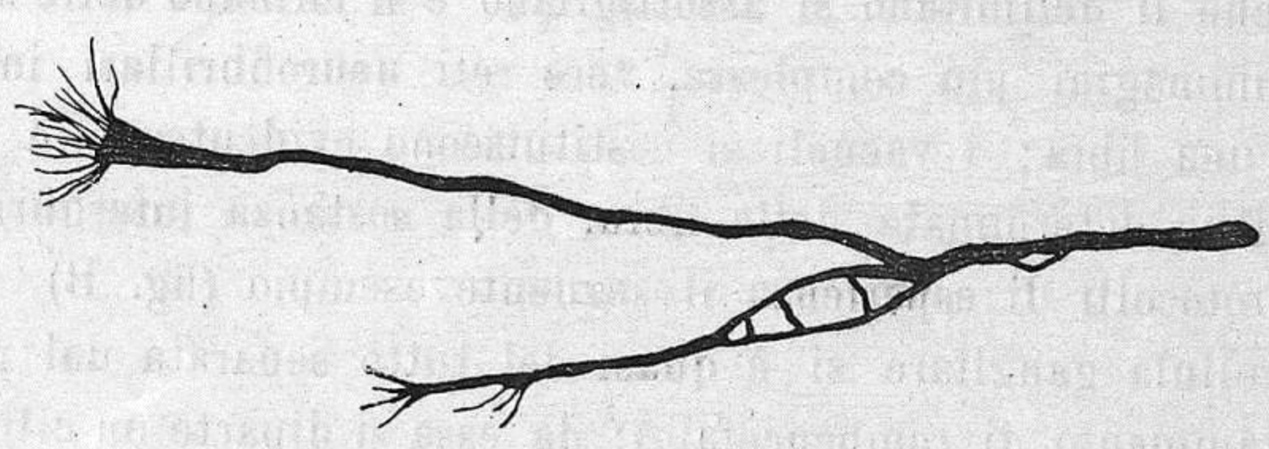
Altre volte abbiamo visto costituirsi, per questa via, delle reti più complesse. In tal caso non vi è dubbio alcuno che la rete si sia formata per dissociazione degli elementi costitutivi di un unico neurite, perchè il neuroblasta, dal quale il neurite si dipartiva, era ben isolato. Ma altre volte (ed è il caso più frequente) le reti si costituiscono sul decorso di un tronco massiccio, che evidentemente risulta di molti neuriti riuniti in un fascio; ed allora l'interpretazione è più difficile.

Spesso queste reti si mantengono a lungo; ma non è neppur rara la loro scomparsa, sia per regressione di filamenti anastomotici, sia per conglutinazione delle fibrille in una massa unica.

1.

2.

3.



4.

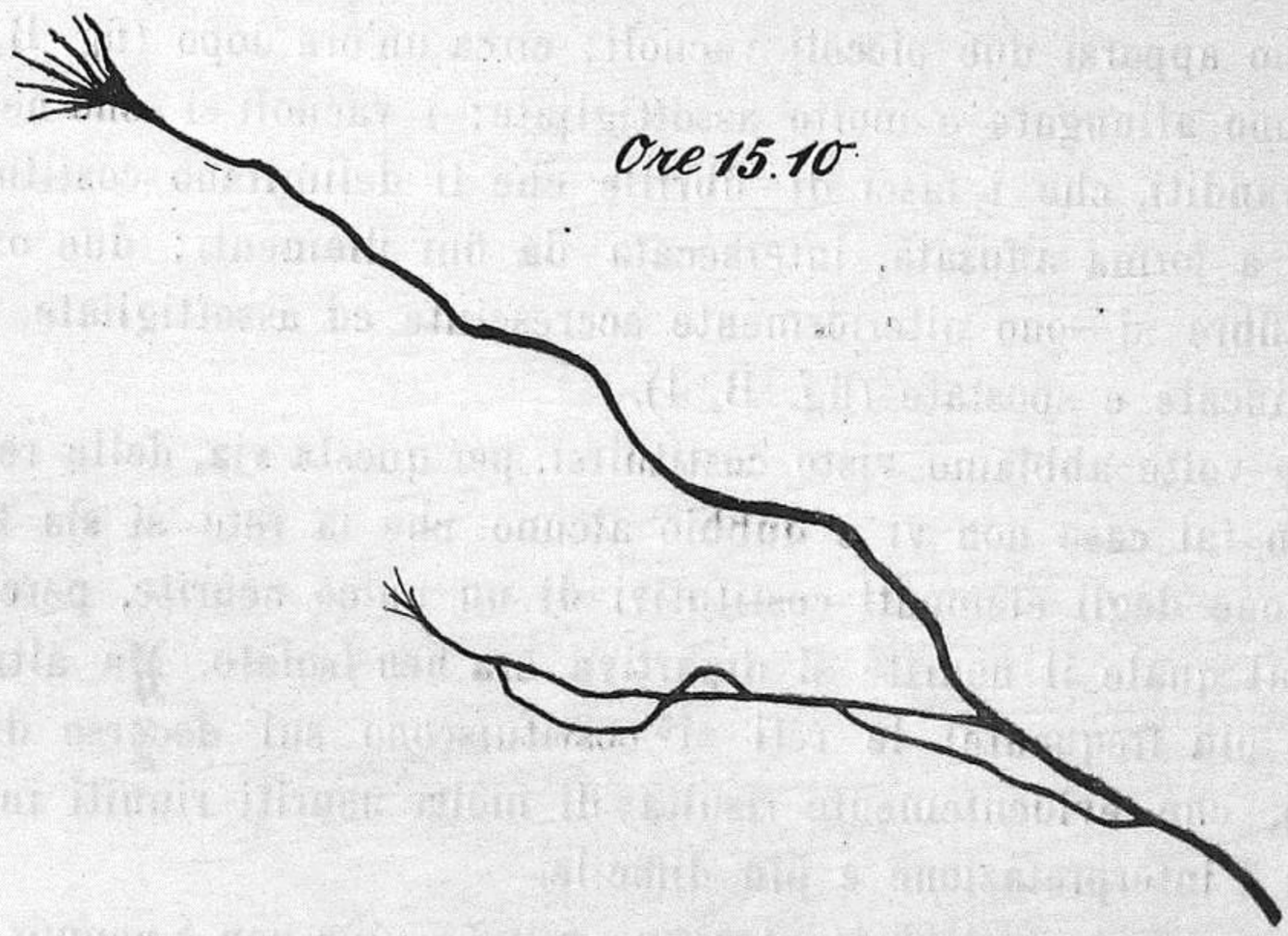


Fig. B. — Da una coltura di 30 ore di un frammento di rombencefalo di un embrione pollo di 3 giorni e 16 ore. Temp. 39°. Apocrom. Imm. Zeiss 3 mm. Oc. 8.